

**Hohe Expressionen von IGF2 und FGFR3 korrelieren  
mit der Tumorprogression in undifferenzierten  
pleomorphen Sarkomen, EGFR- und FGFR3-  
Mutationen sind jedoch selten**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt  
dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Katinka Westermann-Lammers, geb. Rüping  
geboren am 24. März 1986 in Itzehoe**

## **Gutachter**

- 1. Prof. Dr. Thomas Knösel, Ludwig-Maximilians Universität München**
- 2. PD Dr. Florian Gras, Friedrich-Schiller Universität Jena**
- 3. Prof. Dr. Lars Lindner, Ludwig-Maximilians Universität München**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.03.2017**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>2. Zusammenfassung</b>	<b>5</b>
<b>3. Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>3.1. Undifferenziertes pleomorphes Sarkom</b>	<b>6</b>
3.1.1 Geschichte	6
3.1.2 Epidemiologie	7
3.1.3 Lokalisation	8
3.1.4 Ätiologie	8
3.1.5 Klinische Merkmale	8
3.1.6 Makroskopischer Befund	8
3.1.7 Histopathologischer Befund	9
3.1.8 Therapie und Prognose	10
<b>3.2. Antikörper</b>	<b>10</b>
3.2.1 IGF2	10
3.2.2 FGFR1 + 3	11
3.2.3 PDGFR $\alpha$ + $\beta$	12
3.2.4 EGFR	12
3.2.5 Ki67	13
3.2.6 VEGFR2 (KDR)	13
3.2.7 ASMA	14
<b>4. Ziele der Arbeit</b>	<b>14</b>
<b>5. Publizierte Originalarbeit</b>	<b>16</b>
<b>6. Diskussion</b>	<b>24</b>
<b>7. Schlussfolgerung</b>	<b>28</b>
<b>8. Literatur- und Quellenverzeichnis</b>	<b>29</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>34</b>
9.1. Danksagung	34
9.2. Ehrenwörtliche Erklärung	35

## 1. Abkürzungsverzeichnis

Abk.	Erklärung
ALK	Alkohol
ASMA	$\alpha$ -smooth muscle actin
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FNCLCC	Fédération nationale de centres de lutte contre le cancer
GIST	gastrointestinaler Stromatumor
HER	human epidermal growth factor receptor
IGF	insulin-like growth factor
IGFBP	insulin-like growth factor binding protein
IGFR	insulin-like growth factor receptor
IR	insulin receptor
KDR	kinase-insert domain receptor
MAP	mitogen-activated protein
MFH	malignes fibröses Histiozytom
mRNA	messenger ribonucleic acid
NO	Stickstoffmonoxid
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PI3	Phosphoinositid 3
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SADDAN	severe achondroplasia with developmental defect and acanthosis nigricans
STH	Somatotropin
TGF	transforming growth factor
TMA	Tissue Microarray
UPS	undifferenziertes pleomorphes Sarkom
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
WHO	World Health Organization

## 2. Zusammenfassung

**Hintergrund:** Undifferenzierte pleomorphe Sarkome, ehemals bekannt als maligne fibröse Histiozytome (MFH), werden in der aktuellen Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zusammengefasst als eine Gruppe unklassifizierbarer Sarkome, welche keine definierbare Differenzierungslinie aufweisen und somit auch heutzutage noch eine Ausschlussdiagnose darstellen. Es erfordert dringend neue diagnostische, prognostische und therapeutische Ansätze im Bereich dieser Tumoren.

**Methoden:** Wir untersuchten eine Gruppe von 327 Weichteiltumoren aus einem deutschen Konsultations- und Referenzzentrum für Weichteiltumoren, bestehend aus 200 undifferenzierten pleomorphen Sarkomen (UPS), 45 low-grade Sarkomen (10 fibromyxoide Sarkome, 32 myofibroblastische Sarkome und 3 myxoinflammatorisch-fibroblastische Sarkome) und 82 pseudosarkomatösen Tumoren der Faszitis-Familie. Alle Proben wurden immunhistochemischen Analysen mit unterschiedlichen Markern, einschließlich Tyrosinkinaserzeptoren, unterzogen und auf mögliche Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern untersucht. Zusätzlich führten wir Mutationsanalysen bei Proben mit hoher Expression von EGFR und FGFR3 durch.

**Ergebnisse:** Auf Proteinebene konnte eine hohe IGF2-Expression in 86% der UPS nachgewiesen werden, FGFR3 in 69%, PDGFR- $\alpha$  in 62%, PDGFR- $\beta$  in 39%, FGFR1 in 8%, EGFR in 5%, KDR/VEGFR2 in 3 %, ALK in 0% und Ki67 in 63%. Eine hohe IGF2-Expression und eine hohe FGFR3-Expression bei UPS korrelierten statistisch signifikant mit hohem Grading ( $p = 0,023$  bzw.  $p = 0,016$ ) und hohem Ki67-Index ( $p = 0,017$  bzw.  $p = 0,001$ ). Es konnten keine Mutationen in den Hotspots des EGFR-Gens (Exon 18 - 21) und des FGFR3-Gens (Exon 7, 10, 15) in den hoch exprimierten Tumorproben nachgewiesen werden.

**Schlussfolgerungen:** Eine hohe Expression von IGF2 und FGFR3 ist statistisch signifikant assoziiert mit der Tumorprogression, hohem FNCLCC-Grading und hohem Ki67-Index und klassifiziert möglicherweise eine weitere Subgruppe der UPS. Diese Marker könnten zu neuen zielgerichteten Therapiemöglichkeiten dieser Neoplasien führen.

### **3. Einleitung**

#### **3.1 Undifferenziertes pleomorphes Sarkom (UPS)**

In der Klassifikation der World Health Organization (WHO) aus dem Jahr 2013 werden UPS als eine kleine Gruppe von Weichteiltumoren definiert, bei denen keine fassbare, spezifische Differenzierungsrichtung nachweisbar ist, auch nach Verwendung aller heutzutage nutzbaren Technologien. Somit handelt es sich bei der Diagnose dieser Gruppe von Weichteiltumoren auch heutzutage noch lediglich um eine Ausschlussdiagnose (Fletcher et al. 2002).

##### **3.1.1. Geschichte**

Der Begriff des malignen fibrösen Histiozytoms (MFH) ist heute veraltet. Anfang der 1960er Jahre wurde er als eigenständige Tumorentität von Ozzello, O'Brien und Stout in die medizinische Literatur eingeführt (Ozzello et al. 1963, O'Brien und Stout 1964). In ihren Analysen wiesen sie nach, dass sich diese Tumorgruppe von Histiozyten ableitete. Histiozytäres Wachstum zeigte sich sowohl in Gruppen von malignen Histiozytomen als auch bei Fibroxanthomen (Ozzello et al. 1963). Diese Histiozyten hatten sowohl phagozytotische Eigenschaften, konnten jedoch auch als fakultative Fibroblasten Bindegewebsfasern ausbilden. Sie fassten diese Weichteiltumoren als eine Gruppe mit sogenanntem storiformen Wachstumsmuster zusammen, bei der keine verlässlichen histologischen Kriterien erkennbar waren, die es ermöglicht hätten, das Verhalten vorhersagen zu können (O'Brien und Stout 1964).

Anfang der 70er Jahre folgte eine weitere Veröffentlichung von Kempson und Kyriakos über die Entität der MFHs (Kempson und Kyriakos 1972).

In den darauffolgenden Jahrzehnten nahm das MFH als eigenständige Diagnose stark an Bedeutung zu (Fletcher 1992, Dei Tos 2006). Bereits Mitte der 80er Jahre stellten die MFHs mit einem Anteil von bis zu 40% den am häufigsten vorkommenden Sarkomtyp bei Erwachsenen dar (Weiss und Enzinger 1978, Mechttersheimer et al. 2011).

Später kam es jedoch durch neu entwickelte Technologien wie dem Elektronenmikroskop, der Immunhistochemie und der Molekulargenetik zu einem zunehmenden Identitätsverlust der MFHs (Dei Tos 2006). Der wichtigste Meilenstein in dieser Entwicklung war wohl eine Veröffentlichung von Fletcher et al. im Jahr 1992. Die Untersuchung von 159 Fällen so genannter MFHs konnte aufzeigen, dass es sich bei diesem Kollektiv lediglich um einen Sammeltopf für histogenetisch, klinisch und prognostisch sehr unterschiedliche Malignome handelte. Letztendlich entsprachen nur 13% der untersuchten Fälle der ehemaligen MFH-Kategorie (Fletcher 1992).

Mittlerweile konnte die ehemalige Gruppe der MFHs aufgrund neuer Erkenntnisse und Technologien in weitere Subgruppen unterteilt werden. Diese sind unter anderem laut WHO 2002 die Myxofibrosarkome, die angiomatoiden fibrösen Histiozytome, die undifferenzierten pleomorphen Sarkome und die undifferenzierten pleomorphen Sarkome mit prominenter Entzündung oder mit Riesenzellen (Fletcher et al. 2002). Heutzutage wird der Begriff „MFH“ allenfalls noch als Synonym für undifferenzierte pleomorphe Sarkome (UPS) verwendet und beinhaltet nur noch einen Anteil von 5% aller Sarkome bei Erwachsenen (Mechtersheimer et al. 2011, Dei Tos 2006).

### **3.1.2 Epidemiologie**

Die Gruppe der UPS macht heutzutage 5% aller Sarkome bei Erwachsenen aus (Mechtersheimer et al. 2011). Die jährliche Inzidenz beträgt etwa 1 - 2 Fälle pro 100.000 Erwachsene und steigt kontinuierlich mit dem Alter. Es handelt sich somit um einen Tumor des älteren Menschen. Die meisten Patienten sind zum Zeitpunkt der Diagnose älter als 40 Jahre, ein Häufigkeitsgipfel findet sich in der 6. und 7. Lebensdekade. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen mit einem Verhältnis von 1,2 : 1 (Fletcher et al. 2002).

### **3.1.3 Lokalisation**

Undifferenzierte pleomorphe Sarkome finden sich bevorzugt in den tiefen Weichteilen der unteren Extremität. Ein Großteil der Tumoren bildet sich subfaszial in den tiefen Weichteilen, nur wenige entstehen subkutan. Bei retroperitoneal gelegenen Tumoren muss differentialdiagnostisch auch an dedifferenzierte Liposarkome gedacht werden, da diese häufig dort lokalisiert sind (Fletcher et al. 2002).

### **3.1.4 Ätiologie**

Über die Ätiologie des UPS ist bisher nur wenig bekannt. Es wird ein gehäuftes Auftreten im Zusammenhang mit vorangegangener Bestrahlung beschrieben (Laskin et al. 1988), in vereinzelten Fällen scheint das Auftreten auch durch chronische Entzündungen begünstigt zu werden (Fletcher et al. 2002). Ein genauer Mechanismus ist jedoch bisher nicht bekannt.

### **3.1.5 Klinische Merkmale**

Typischerweise handelt es sich bei UPS um große, tief sitzende Tumoren. Sie weisen ein progressives Wachstumsverhalten auf und können bei schneller Größenzunahme Schmerzen verursachen. Aufgrund ihrer insgesamt eher gering ausgeprägten Symptomatik, werden sie jedoch häufig spät diagnostiziert. Etwa 5% der Patienten haben zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Metastasen, in den meisten Fällen handelt es sich hierbei um pulmonale Metastasen (Fletcher et al. 2002, Mechtersheimer et al. 2011).

### **3.1.6 Makroskopischer Befund**

Die Größe der Tumoren ist sehr unterschiedlich und beträgt im Durchschnitt 5 bis 15 cm im maximalen Durchmesser. Die Größe hängt unter anderem von der Lokalisation ab. So weisen subkutan gelegene Tumoren einen eher kleinen



Durchmesser von weniger als 5 cm auf, retroperitoneal gelegene UPS hingegen können ein ausgeprägtes Wachstumsverhalten aufweisen und einen Durchmesser von mehr als 20 cm erreichen. Bei den UPS handelt es sich in der Regel um gut abgrenzbare Tumoren. Teilweise werden sie von einer Pseudokapsel umgeben.

Wie die Größe erscheint auch das makroskopische Erscheinungsbild sehr variabel. Es scheint keine typischen makroskopischen Eigenschaften zu geben. So variieren bei Betrachtung der Schnittfläche eines UPS feinfaserige und fleischartige Areale und teilweise kommen auch nekrotische, hämorrhagische oder auch myxoide Bereiche vor (Fletcher et al. 2002).

### **3.1.7 Histopathologischer Befund**

Alle UPS haben gemeinsam, dass ihnen nach Einsatz aller heutzutage zur Verfügung stehenden morphologischen, immunphänotypischen und molekularen Techniken bisher keine klare Differenzierungsrichtung nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich somit immer noch lediglich um eine Ausschlussdiagnose (Mechtersheimer et al. 2011). Histopathologisch weisen UPS ein sehr heterogenes Erscheinungsbild auf. Sie erscheinen sehr zellreich oder aber auch etwas zellärmer mit einem hohen Bindegewebsanteil (Fletcher et al. 2002, 2013).

Es findet sich in unterschiedlicher Ausprägung eine kollagenfaserhaltige Matrix mit zytologischen und nukleären Pleomorphien, häufig begleitet von bizarren Riesenzellen, spindeligen und ovalären Tumorzellen, welche oft ein storiformes Wachstumsmuster aufweisen. Durchmischt werden diese zum Teil von unterschiedlich zahlreichen Histiozyten und Schaumzellen. Häufig finden sich atypische Mitosen und Nekrosen, welche die proliferative Aktivität widerspiegeln (Mechtersheimer et al. 2011, Fletcher et al. 2002, 2013, Fletcher 1992). Die fusiformen Zellen können fibroblastisch, myofibroblastisch oder auch glattmuskulär in Erscheinung treten (Fletcher et al. 2002).

### **3.1.8 Therapie und Prognose**

Nach wie vor steht bei der Behandlung von Weichteiltumoren die vollständige chirurgische Resektion im Vordergrund. Bisher scheint keine neoadjuvante oder adjuvante Therapie eine Alternative zu sein, wenn man das Gesamtüberleben der Patienten betrachtet (Lehnhardt et al. 2009, Fleming et al. 1999). Das Ansprechen von Weichteilsarkomen auf Chemotherapie ist sehr gering (Rikhof et al. 2009). Die 5-Jahres-Mortalitätsrate beträgt etwa 40 - 50% (Fletcher et al. 2002).

## **3.2 Antikörper**

### **3.2.1 Insulin-like growth factor 2 (IGF2)**

Das IGF-Signalsystem ist bekannt dafür, dass es eine entscheidende Rolle in Wachstum, Funktion und Entwicklung von verschiedenen Geweben spielt (LeRoith und Roberts 2003). Das IGF-Signalsystem besteht aus drei Liganden (IGF1, IGF2 und Insulin), vier unterschiedlichen Membranrezeptoren (IGF1R, IGF2R, Insulinrezeptor (IR) und Hybridrezeptoren) und sechs IGF-Bindungsproteinen (IGFBP 1 – 6) (Rikhof et al. 2009). Als Liganden agieren die beiden Peptidhormone IGF1 (70 Aminosäuren) und IGF2 (67 Aminosäuren) sowie Insulin. IGF1 und IGF2 werden hauptsächlich in der Leber produziert. Die IGF1-Expression wird über das Wachstumshormon STH gesteuert, die IGF2-Expression hingegen ist relativ unabhängig davon. Beide Liganden interagieren mit dem IGF1-Rezeptor (IGF1R) der Zelloberfläche. IGF1R ist ein membranständiges Molekül, bestehend aus zwei  $\alpha$ -Untereinheiten und zwei  $\beta$ -Untereinheiten. Bindet ein Ligand an die extrazelluläre  $\alpha$ -Untereinheit, wird über eine Konformationsänderung die Autophosphorylierung verschiedener Tyrosinreste in der  $\beta$ -Untereinheit initiiert. Es handelt sich somit um einen Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität. Auf diesem Weg können unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden. Hierbei spielen der Signalweg der MAP-Kinase und der Signalweg der PI3-Kinase eine große Rolle. IGF2 bindet zusätzlich auch an den IGF2-Rezeptor. Des Weiteren spielen im IGF-System noch die IGF-Bindungsproteine eine wichtige Rolle. Sie werden gewebespezifisch exprimiert und gelten als wichtige Modulatoren der lokalen Wirkungen der IGFs (LeRoith und Roberts 2003, Rikhof et al. 2009).

In vielen Studien wurde das IGF-System bereits mit der Entwicklung und Progression von Tumoren in Verbindung gebracht (Busund et al. 2004, Khandwala et al. 2000, LeRoith und Roberts 2003, Rikhof et al. 2009, Steigen et al. 2009).

### **3.2.2 Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 1 und 3**

FGF-Rezeptoren umfassen eine Gruppe von vier strukturell verwandten Rezeptoren (FGFR 1 - 4) mit Tyrosinkinaseaktivität. Bei ihren Liganden handelt es sich um Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (fibroblast growth factors, FGFs) (Turner und Grose 2010).

Diese Familie der Wachstumsfaktoren mit ihren Rezeptoren spielt eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen zellulären Prozessen, unter anderem der Regulation des Zellwachstums, der Differenzierung von Zellen, Regulation der Angiogenese, Wundheilung sowie der embryonalen Entwicklung (Martinez-Torrecuadrada et al. 2005, Turner und Grose 2010).

Die FGF-Rezeptoren verfügen über drei unterschiedliche extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domänen (Immunglobulin I-III) zur Ligandenbindung, außerdem über eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne (Martinez-Torrecuadrada et al. 2005).

Durch alternatives Spleißen der mRNA können noch weitere Isoformen der Rezeptoren erstellt werden. Dies ermöglicht eine große Vielfalt an Signalwegen. (Murgue et al. 1994).

Genetische Veränderungen in der FGFR-Familie wurden in der Vergangenheit bereits in vielen Studien in Zusammenhang mit unterschiedlichen Erkrankungen gebracht. So zeigten verschiedene Studien, dass eine Überexpression und aktivierte Mutationen im FGFR3-Gen mit autosomal dominanten Skeletterkrankungen assoziiert sind. Hierzu zählen zum Beispiel Hypochondroplasie, Achondroplasie, SADDAN (severe achondroplasia with developmental defect and acanthosis nigricans) und thanatophore Dysplasie (van Rhijn et al. 2002, Vajo et al. 2000).

Außerdem zeigt der komplexe Signalweg der FGFR-Familie einerseits potentiell onkogene, andererseits tumorsuppressive Funktionen (Turner und Grose 2010, Kohler et al. 2012).

Innerhalb der letzten Jahre konnten genetische Alterationen wie Amplifikation, Mutation und Translokation in der FGFR-Familie identifiziert werden, die in Verbindung mit verschiedenen Tumoren stehen, wie zum Beispiel Blasen-, Lungen-, Magen-, Endometrium-, Prostata- und Zervixkarzinom (Turner und Grose 2010, Kohler et al. 2012, Cappellen et al. 1999, Dutt et al. 2008, Hernandez et al. 2009, Kunii et al. 2008).

### **3.2.3 Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) $\alpha$ und $\beta$**

Bei den PDGFs handelt es sich um eine aus vier Wachstumsfaktoren (PDGF-A bis -D) bestehende Gruppe, die als Mitogene auf Zellen wirken. Die beiden dazugehörigen Rezeptoren sind PDGF-Rezeptor (PDGFR)  $\alpha$  und  $\beta$ . Auch hierbei handelt es sich um Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität (Shim et al. 2010).

PDGFs spielen besonders im Rahmen der Embryogenese eine wichtige Rolle als Wachstumsfaktoren für Fibroblasten, glatte Muskelzellen und Gliazellen, sowie bei der Wundheilung und der Angiogenese (Kohler und Lipton 1974, Ross et al. 1974).

PDGFs treten in Dimeren in Erscheinung, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Auf diese Weise verbinden sie jeweils zwei Rezeptoren. Der PDGFR- $\alpha$ -Signalweg ist beteiligt an der Entwicklung vieler Organe im Rahmen der Embryogenese, wie z.B. des Magens, der Neuralleiste, der Lunge, der Niere und der Haut. PDGFR- $\beta$  hingegen spielt eine Rolle bei der frühen Hämatopoese und der Bildung von Blutgefäßen (Andrae et al. 2008, Shim et al. 2010).

Auch das PDGF-Signalsystem wurde mit der Entwicklung von Krebs in Verbindung gebracht. Es unterstützt die Krebszellen unter anderem hinsichtlich der Proliferation und der Metastasierung. Außerdem fördert es die Angiogenese der umgebenden Gefäßsysteme (Liu et al. 2011, Jechlinger et al. 2006).

### **3.2.4 Epidermal growth factor receptor (EGFR)**

Der EGF-Rezeptor ist ein Mitglied der HER-Familie und gehört ebenfalls zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen. Der Transmembranrezeptor kommt beim Menschen in allen Zellarten vor und hat einen wichtigen Anteil an der Organentwicklung.

Als Ligand fungiert hauptsächlich der epidermal growth factor (EGF), außerdem unter anderem der transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ). Bei beiden Liganden handelt es sich um Wachstumsfaktoren.

EGFR konnte bereits bei verschiedenen Tumorarten in hochregulierter oder auch in mutierter Form nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang werden durch die Aktivierung der Rezeptoren das unkontrollierte Wachstum und die Vermehrung von Tumorzellen mit Metastasenbildung gefördert.

In der Krebstherapie gibt es bereits zugelassene Substanzen, wie zum Beispiel den monoklonalen Antikörper Cetuximab, die gezielt das Signal von EGFR blockieren. Sie spielen heutzutage eine wichtige Rolle in der gezielten Krebstherapie (Dutta und Maity 2007; Oda et al. 2005).

### **3.2.5 Ki-67**

Das Antigen Ki-67 ist ein Protein, das mit der Proliferation von Zellen direkt in Verbindung steht. Es dient als Marker von sich teilenden menschlichen Zellen. Dies ist möglich, da das Protein während aller aktiven Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2- und M-Phase) vorhanden ist. Ruhende Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, exprimieren das Protein hingegen nicht. Mithilfe des Ki-67 kann man somit die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation bestimmen. Die Expression von Ki-67 gibt unmittelbar Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors (Scholzen und Gerdes 2000).

### **3.2.6 Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)**

VEGFR2, auch bekannt unter dem Namen kinase insert domain-Rezeptor (KDR), gehört ebenfalls zu den Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität. Die Familie der VEGF-Rezeptoren umfasst drei unterschiedliche Rezeptoren (VEGFR 1 - 3) mit unterschiedlichen Affinitäten zu den Liganden. Als Liganden dienen die vascular endothelial growth factors (VEGF A - F). VEGF findet sich in allen vaskulären Geweben des Menschen und stimuliert hauptsächlich das vaskuläre Endothel. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Angiogenese. Die Produktion von VEGF wird

beispielsweise im Rahmen einer Hypoxie hochreguliert. Außerdem fördert VEGF die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und kann somit zur Vasodilatation und zum Absinken des Blutdruckes führen.

Bei einer Reihe von Tumoren konnte eine erhöhte Expression von VEGF nachgewiesen werden. Durch die Entwicklung von VEGF-Inhibitoren (Anti-VEGFs) kann die Gefäßproliferation eingedämmt werden. Heutzutage sind Anti-VEGFs aus der Therapie von verschiedenen Tumoren und auch anderen Erkrankungen, wie zum Beispiel der feuchten Makuladegeneration, nicht mehr wegzudenken (Holmes et al. 2007, Ylä-Herttuala et al. 2007, Karkkainen und Petrova 2000).

### **3.2.7 Alpha-smooth muscle actin (ASMA)**

Das  $\alpha$ -Aktin ist ein wichtiger Proteinbestandteil des kontraktilen Apparates des Menschen. Es sind 6 Isoformen bekannt, unter anderem die glattmuskuläre Form ASMA. Es zählt zu den immunhistochemischen myogenen Markern. Bei Tumoren lässt sich mit Hilfe des Markers klären, ob die Tumorzellen von Muskelzellen abgeleitet sind. Somit dient es der Differenzierung von Tumorentitäten (Skalli et al. 1986).

## **4. Ziele der Arbeit**

In dieser Arbeit haben wir:

- die Expression von verschiedenen immunhistochemischen Markern, einschließlich Rezeptor-Tyrosinkinasen, auf Proteinebene bei Weichteilsarkomen untersucht, beinhaltend UPS, low-grade fibromyxoide Sarkome, low-grade myofibroblastische Sarkome und myxoinflammatorisch-fibroblastische Sarkome sowie pseudosarkomatöse Tumoren der Fasciitis-Familie,
- die Korrelation der Expression mit klinisch-pathologischen Daten analysiert,
- Mutationsanalysen bei Tumoren mit hoch exprimierten Rezeptor-Tyrosinkinasen durchgeführt, um mögliche aktivierte Mutationen zu

identifizieren, die für eine spezifische Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren verwendet werden könnten.

## 5. Publierte Originalarbeit

J Cancer Res Clin Oncol  
DOI 10.1007/s00432-014-1700-9

ORIGINAL ARTICLE – CANCER RESEARCH

# High IGF2 and FGFR3 are associated with tumour progression in undifferentiated pleomorphic sarcomas, but EGFR and FGFR3 mutations are a rare event

Katinka Rüping · Annelore Altendorf-Hofmann · Yuan Chen ·  
Eric Kampmann · Sebastian Gibis · Lars Lindner · Detlef Katenkamp ·  
Iver Petersen · Thomas Knösel

Received: 13 December 2013 / Accepted: 26 April 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

### Abstract

**Aim** Pleomorphic undifferentiated sarcomas (formerly known as malignant fibrous histiocytomas) are recognised by the actual WHO classification as an undifferentiated, unclassifiable category of pleomorphic sarcomas which show no definable line of differentiation and are still a diagnosis of exclusion. Therefore, diagnostic, prognostic and therapeutic options of these tumours are urgently needed.

**Methods** Three hundred and twenty-seven spindle cell tumours of a German consultation and reference centre of soft tissue tumours consisting of 200 undifferentiated pleomorphic sarcomas (UPS), 45 low-grade sarcomas (10 low-grade fibromyxoid sarcomas, 32 low-grade myofibroblastic sarcomas and three myxoinflammatory fibroblastic sarcomas) and 82 tumours of the fasciitis family were revisited. The specimens were analysed immunohistochemically with distinct markers including tyrosine kinases and expression correlated with clinicopathological parameters. Additionally, mutational analysis was performed on specimens with high expression of EGFR and FGFR3.

**Results** At the protein level high IGF2 expression was observed in 86 %, FGFR3 (69 %), PDGFRA (62 %), PDGFRB (39 %), FGFR1 (8 %), EGFR (5 %), KDR/VEGFR2 (3 %), ALK (0 %) and high Ki67 (63 %) in UPS. High expressions of IGF2 and FGFR3 are significantly correlated with a higher grading ( $p = 0.023$  and  $p = 0.016$ , respectively) and a high Ki67 index ( $p = 0.017$  and  $p = 0.001$ , respectively). No mutations were found in the hot spots of tumour specimens with a high expression of EGFR gene (exons 18–21) and FGFR3 gene (exons 7, 10 and 15).

**Conclusions** High expressions of IGF2 and FGFR3 are significantly associated with tumour progression, grading and Ki67 and might classify a subgroup of undifferentiated pleomorphic sarcoma. These markers might guide targeted therapies in these neoplasms.

**Keywords** IGF2 · FGFR3 · Undifferentiated pleomorphic sarcomas · Immunohistochemistry · Mutational analysis · Tyrosine kinases

K. Rüping · Y. Chen · D. Katenkamp · I. Petersen · T. Knösel  
Institute of Pathology, Friedrich-Schiller University, Jena,  
Germany

A. Altendorf-Hofmann  
Department of General, Visceral and Vascular Surgery, Friedrich-Schiller University, Jena, Germany

E. Kampmann · S. Gibis · L. Lindner  
Department of Oncology, Grosshadern Med. III, Ludwig-Maximilians Universität (LMU), Munich, Germany

**Present Address:**  
T. Knösel (✉)  
Institute of Pathology, Ludwig-Maximilians Universität (LMU),  
Thalkirchnerstr. 36, 80337 Munich, Germany  
e-mail: Thomas.Knoesel@med.uni-muenchen.de

### Introduction

Until a decade ago, the so-called pleomorphic and storiform malignant fibrous histiocytoma (MFH) represented the most frequently diagnosed sarcoma, accounting for approximately 40 % of adult sarcomas. Nowadays, the term MFH is recognised as a morphological growth pattern shared by a wide variety of poorly differentiated malignant neoplasms which include specific subtypes of pleomorphic sarcomas, e.g. myxofibrosarcoma or pleomorphic liposarcoma. The latest WHO classification of soft tissue tumours recognises the existence of an undifferentiated, unclassifiable category of pleomorphic sarcoma and defines it as undifferentiated pleomorphic sarcomas (UPS) in which any attempt to disclose



**Table 1** Clinicopathological parameter of the tumour collective including undifferentiated pleomorphic sarcomas, low-grade sarcomas and tumours of the fasciitis family

	UPS		Low-grade sarcoma		Fasciitis	
Total (n)	200		45		82	
Age						
Median	67		57		39	
Minimum	18		7		4	
Maximum	94		88		73	
	Number	%	Number	%	Number	%
Sex						
M	104	52.0	29	64.4	42	51.2
W	96	48.0	16	35.6	40	48.8
Anatomic location						
Head and neck	19	9.5	4	8.9	10	12.2
Trunk	68	34	9	20	23	28
Upper extremities	31	15.5	11	24.4	33	40.2
Lower extremities	68	34	19	42.2	14	17.1
Other	8	4	2	4.4	0	0
Unknown	6	3	0	0	2	2.4
Size						
≤5 cm	25	30.9	11	50.0	12	92.3
>5 cm	56	69.1	11	50.0	1	7.7
Unknown	119		23		69	
Spindle cell type						
Yes	146	73.0	39	86.7	n.a	n.a
No	54	27.0	6	13.3	n.a	n.a
FNCLCC grading						
Low	n.a.	n.a.	45	n.a	n.a.	n.a.
Moderate	58	29	n.a	n.a	n.a	n.a
High	142	71	n.a	n.a	n.a	n.a

n.a. not applicable

their line of differentiation has failed (Dei Tos 2006; Fletcher et al. 2001, 2013). Undifferentiated/unclassified sarcoma is still a diagnosis of exclusion until we will find clinically relevant subgroups. However, these tumours do exist, their prognostic and therapeutic options should be characterised, and a subclassification of these sarcomas is needed.

Our objectives in this study were (1) to test the expression of different immunohistochemically markers including receptor tyrosine kinases (RTKs) on protein level in spindle cell sarcomas including UPS, low-grade fibromyxoid sarcomas, low-grade myofibroblastic sarcomas and myxoinflammatory fibroblastic sarcomas and tumours of the fasciitis family, (2) to correlate the expression with clinicopathological parameters and (3) to perform mutational analyses of tumours with highly expressed receptor tyrosine kinases identifying activating mutations that might be eligible for a specific kinase inhibitor therapy.

## Materials and methods

### Tumour samples

Tissue samples of soft tissue tumours were retrieved from the archives of the institute of pathology at the Friedrich-Schiller University in Jena which is a consultation and reference centre of soft tissue tumours in Germany. All samples were consultation cases between 2007 and 2010. The collection altogether comprises 327 soft tissue tumours consisting of 200 undifferentiated pleomorphic sarcomas, 45 low-grade sarcomas (10 low-grade fibromyxoid sarcomas, 32 low-grade myofibroblastic sarcomas and three myxoinflammatory fibroblastic sarcomas) and 82 pseudo-sarcomatous tumours of the fasciitis family. The anatomic location of the tumours is summarised in Table 1. Histology was reviewed in all tumours to confirm the diagnosis

**Table 2** Antibodies for immunohistochemistry

Antigen	Product no.	Supplier	Dilution	Pre-treatment
Ki 67	M7240	DAKO	1:1,000	Microwave
PDGFRA	P1721C01	DCS	1:200	Microwave
PDGFRB	516-2734	Zytomed	1:50	Protease
ALK	M7195	DAKO	1:100	Microwave
EGFR	M7239	DAKO	1:250	Protease
KDR (VEGF 2)55B11		Cell signalling	1:300	Microwave
IGF 2	ab9574	Abcam	1:100	Microwave
FGFR 1	ab71928	Abcam	1:100	Microwave
FGFR 3	sc-123	Santa Cruz	1:50	Microwave
ASMA	1A4	DAKO	1:500	Microwave

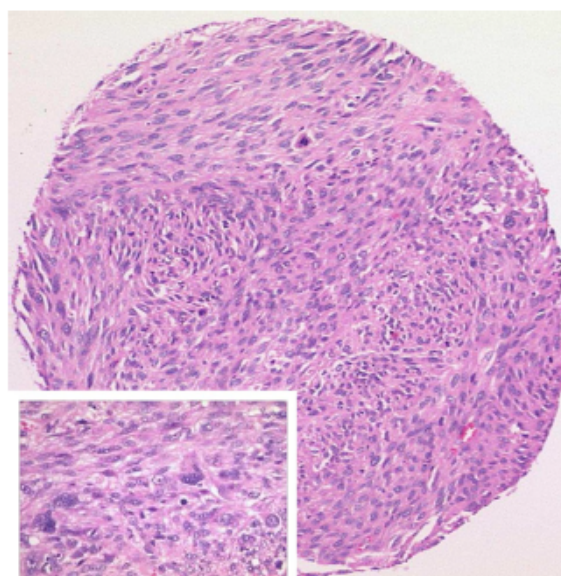
(K.R. and T.K.). Data on clinical parameters (sex, age, date of examination, tumour size, localisation) and pathological findings (FNCLCC grading) were obtained from pathologists' original reports. A tissue microarray was assembled using 0.6-cm punch biopsies from all samples according to standard procedures using duplicates (Knosel et al. 2005). Additionally, another tissue microarray (TMA) was generated with 81 undifferentiated pleomorphic sarcomas (UPS) with known clinicopathological parameters including patients' survival.

#### Immunohistochemistry

Commercially available antibodies against IGF2, PDGFRA, PDGFRB, FGFR1, FGFR3, Ki67, ASMA, EGFR, KDR (VEGFR2) and ALK were applied for the immunohistochemical analysis (Table 2). Immunohistochemical staining was performed according to standard procedures. Briefly, slides were pre-treated as indicated in Table 2 and then incubated with the antibodies, followed by antibody detection using a biotinylated antimouse secondary antibody and a multilink biotin-streptavidin-amplified detection system (Biogenex, San Ramon, CA). Staining was visualised using a Fastred chromogen system (DAKO, Hamburg, Germany). The expression was scored semi-quantitatively by a 4-tier scale: 0—negative (0–5 %), 1—weak (6–20 %), 2—moderate (21–50 %) and 3—strongly positive (51–100 %), Fig. 1). This was reduced to a 2-tier system (0/1—low expression and 2/3—high expression) for the independently performed statistical analysis of single proteins and their correlation with clinicopathological parameters.

#### EGFR and FGFR3 mutational analysis

The mutational analysis was performed in the institute of pathology of the Friedrich-Schiller University in Jena, which is one of the certified laboratories for KIT and



**Fig. 1** Representative example of haematoxylin-eosin-stained UPS ( $\times 10$  magnification, inset  $\times 40$  magnification)

K-RAS mutational analysis in Germany. Genomic DNA was isolated from all highly expressed specimens (score 3,  $n = 45$ ) and mutational analysis of the hot spot EGFR (exon 18–21) and FGFR3 (exon 7, 10 and 15) was performed from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue using a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany). Two hundred nanograms (200 ng) of genomic DNA was subjected to PCR amplification using Hot Taq DNA Polymerase (PeQlab, Germany) with the primer sequences as previously described (Bakkar et al. 2003; Do et al. 2008). PCR conditions were 94 °C 1 min, relevant annealing temperatures were 63 °C for FGFR3 exon 7, 10 and 15 and 60 °C for EGFR exon 18–21 followed by 72 °C 45 s for 40 cycles, after denaturation at 95 °C for 15 min (Fig. 2).

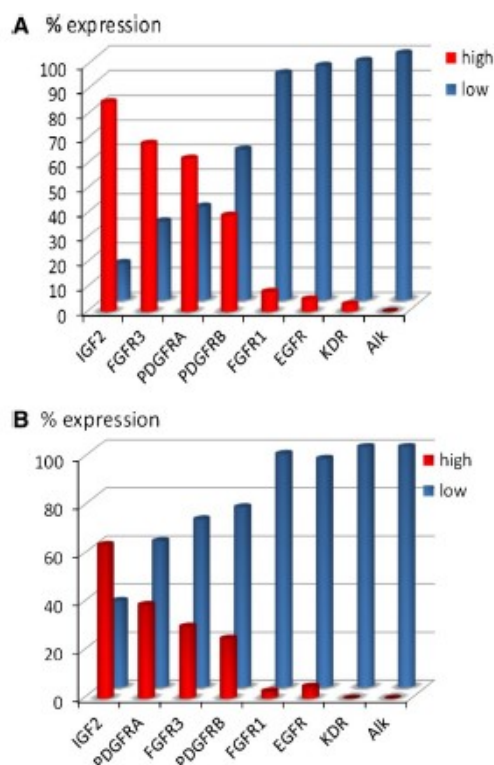
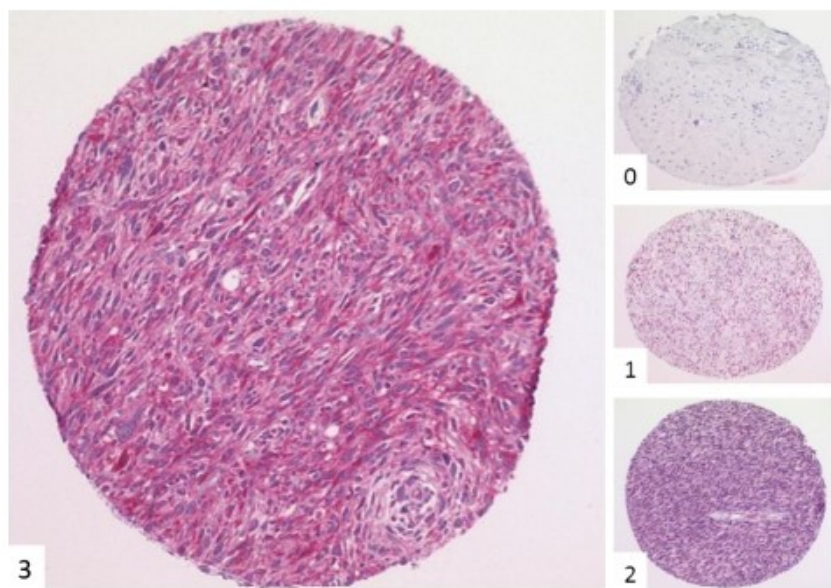
The PCR products were purified using DNA clean and concentration kit (Zyme Research, Germany) and applied for direct sequencing based on capillary DNA electrophoresis (LGC, Berlin Germany) in both directions. Every sequence was compared to a NCBI human gene nucleotide sequence and blasted using a NCBI Standard Nucleotide Blast Search to determine the presence of mutation within a particular exon (Fig. 3).

#### Statistical analyses

Fisher's exact test and Pearson's chi-squared test were used to analyse the correlation between the parameters as indicated. Statistical significance was declared if the  $p$  value was  $<0.05$ . Follow-up was performed in outpatient clinics



**Fig. 2** Immunohistochemical detection of IGF2 and scoring of protein expression by a 4-tier system: 0—no expression, 1—low, 2—moderate and 3—strong expression ( $\times 40$  magnification)



**Fig. 3** Expression of immunohistochemical data of **a** undifferentiated pleomorphic sarcomas (UPS) and **b** low-grade sarcomas showing higher expression of tyrosine kinases in high-grade tumours

or by contacting the patients' general practitioner, and data were updated until September 2013. Survival was calculated from the date of first diagnosis. Statistical analyses were performed by SPSS 20.0 (SPSS, Chicago, IL) software. Survival curves were calculated by the Kaplan–Meier method. The log-rank test was used to assess differences in survival.

## Results

### General data

The clinicopathological data are summarised in Table 1. The median age of patients with UPS was 67 years at time of consultation. The peak incidence is between the sixth and seventh decade of life. In the group of low-grade sarcomas, the median age was 57 years, and patients with pseudosarcomatous tumours of the fasciitis family showed a median age of 39 years. Men are affected in 52 % of UPS cases, women in 48 %. The gender ratio in low-grade sarcomas was about 1.8:1 in fasciitis about 1:1. The majority of UPS tumours are located at the trunk and lower extremities. Most low-grade sarcomas were localised on the lower limbs (42.2 %), most fasciitis tumours on the upper limbs (40.2 %).

### Immunohistochemistry

The results of the tumour collective and all antibodies are summarised in Table 3. High expression of IGF2, FGFR3,

**Table 3** Expression of different antibodies

	UPS		Low-grade sarcomas		Fasciitis		<i>p</i> value
	<i>n</i>	High expression (%)	<i>n</i>	High expression (%)	<i>n</i>	High expression (%)	
IGF 2	197	86.3	44	63.6	82	29.3	<0.001
PDGFRA	200	62.5	43	41.9	82	42.7	0.002
FGFR3	192	69.3	43	32.6	80	22.5	<0.001
Ki 67	200	63.0	45	4.4	82	31.7	<0.001
ASMA	198	13.6	44	18.2	82	20.7	0.311
PDGFRB	199	39.2	44	25.0	80	30.0	0.113
FGFR 1	200	8.0	44	2.3	81	4.9	*
EGFR	200	4.5	44	4.5	82	0	*
KDR (VEGFR 2)	200	2.5	45	0	82	0	*
ALK	200	0	45	0	82	0	*

\* No statistical test required due to a small number of cases

Ki67 and PDGFRA was detected in about two-thirds of UPS (Table 3). High expression of these markers correlated significantly with high-grade tumours versus low-grade tumours and tumours of the fasciitis family. With respect to those cases with high expression, however, none of these markers seems to be useful in differential diagnoses between the three tumour entities despite the statistically significant differences of high expression rates. If any, then Ki67 seems to be the most suitable marker for distinguishing between UPS and low-grade sarcomas (63 vs. 4.4 %). It demonstrates the best sensitivity and specificity (63 and 96 %, respectively). According to a positive predictive value of 98 %, high expression of Ki67 suggests that UPS is likely in all. The negative predictive value is 37 %, so in case of low expression, a distinction between UPS and low-grade sarcomas is not possible. Nevertheless, the high expression of IGF2, PDGFRA, FGFR3 and Ki67 in UPS reflects the high correlation of these proteins with tumour progression in sarcomas.

#### Immunohistochemistry in correlation with clinicopathological parameters

The analysis of protein expression with the clinicopathological parameters shows that high IGF2 expression significantly correlated with high FNCLCC grading ( $p = 0.023$ ) and high Ki67 index ( $p = 0.017$ ). High IGF2 expression occurred more often in large tumours ( $p = 0.063$ ) than in smaller ones. High FGFR3 expression significantly correlated with high FNCLCC grading ( $p = 0.016$ ) and high Ki67 ( $p = 0.001$ ). No differences between spindle cell and epitheloid/pleomorphic growth pattern were detected. Analysing the additionally generated TMA of UPS with 10-year survival, high protein expression of IGF2 and FGFR3 expression level was observed in 66 % of the G3 tumours and only in 46 % of the G2 tumours. However, the

$p$  value was not significant ( $p = 0.146$ ) and high expression of IGF2 and FGFR3 as documented by the Kaplan–Meier curves did not reveal any significant correlation with patient survival. The increased percentages of strong expression in G3 tumours are compatible with a potential role in tumour progression, but according to our analysis, they are not sufficient to be applied as prognostic markers. No additional statistically significant correlations were observed.

#### Mutational analyses

No mutations were found in the hot spots of EGFR gene (exons 18–21) and FGFR3 gene (exons 7, 10 and 15) in highly expressed tumours ( $n = 45$ ).

#### Discussion

The successful treatment of advanced GISTs with receptor tyrosine kinase (RTK) inhibitors has raised the hope that other malignancies could also benefit from the similar treatment (Antonescu et al. 2009; Barretina et al. 2010). Recent clinical trials with multitargeting tyrosine kinase inhibitors give new hope for metastatic soft tissue sarcomas. However, reliable predictive and prognostic markers are urgently needed in soft tissue tumours. These markers might identify activating mutations that might be eligible for a specific kinase inhibitor therapy (Endo and Nielsen 2012; van der Graaf et al. 2012).

Revisiting 327 soft tissue tumours of a major consultation and reference centre in Germany, we were able to analyse the protein expression of different markers including RTKs in a well-characterised cohort including undifferentiated pleomorphic sarcoma (UPS), low-grade fibromyxoid sarcomas, low-grade myofibroblastic sarcomas and



myxoinflammatory fibroblastic sarcomas and tumours of the fasciitis family. Furthermore, we correlate the expression of the different antibodies with clinicopathological parameters and perform mutational analyses of tumours with highly expressed receptor tyrosine kinases of EGFR and FGFR3 trying to identify activating mutations that might be eligible for a specific kinase inhibitor therapy.

We studied 10 markers using the synergy of TMA and immunohistochemistry as a standard methodology for in situ protein analysis. The combination of immunohistochemistry and TMA technology allows for the simultaneous analysis of hundreds of tissue specimens with an unprecedented degree of experimental standardisation (Hamidov et al. 2011). To our knowledge, this is the largest study analysing the expression of RTKs in spindle cell sarcomas. In UPS, we found a high expression of IGF2 in 86 %, FGFR3 in 69 %, PDGFRA in 62 %, PDGFRB in 39 %, FGFR1 in 8 %, EGFR in 5 % and KDR (VEGFR2) in 3 %, giving a rationale for testing the soft tissue tumour specimens for activating mutations before applying the specifically designed drug.

Our study show that high expression of IGF2 on the protein level occurred significantly more often in UPS cases than in low-grade sarcomas and tumours of the fasciitis family. Furthermore, high expression of IGF2 was significantly correlated with G3 tumours in UPS (G3 vs. G2,  $p < 0.05$ , FNCLCC), large tumour size and high Ki67. The insulin-like growth factor (IGF) signalling system is known to play a decisive role in growth, function and development of many tissues (LeRoith and Roberts 2003). It consists of three ligands, IGF1, IGF2 and insulin, interacting with the cell-surface IGF1-receptor (IGF1R), which possesses tyrosine kinase activity (Rikhof et al. 2009; Steigen et al. 2009). In many studies, the IGF system has already been implicated with the development and progression of tumours (LeRoith and Roberts 2003; Rikhof et al. 2009; Steigen et al. 2009; Busund et al. 2004; Khandwala et al. 2000). Interestingly, Steigen et al. published a study of 65 specimens indicating an IGF2 overexpression in 32 % of UPS (Steigen et al. 2009). In our 200 cases, we could detect a high expression of 86 % supporting the results in a larger collective with a higher percentage of positive cases. In particular, in regard to future treatment options, it seems to be a promising course like the treatment of Ewing's sarcomas with the human anti-IGF-R1 antibody R1507 to treat UPS via the IGF2 pathway (Kurzbach et al. 2010; Yuen and Macaulay 2008). However, IGF1R seems not to be a predictive marker in a clinical study of soft tissue sarcomas published very recently (Schwartz et al. 2013). Lehnhardt et al. found that negative surgical margins, size and grading had a highly significant influence on overall survival of their 140 patients with UPS, whereas the site of surgery and adjuvant chemotherapy, adjuvant radiation

and tumour depth did not (Lehnhardt et al. 2009). Similar results for tumour size and grading were found by the surgeons of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (Koea et al. 2003).

High expression of FGFR3 was detected in 69.3 % of our UPS specimens and correlated statistically significant with high FNCLCC grading ( $p = 0.016$ ) and high Ki67 index ( $p = 0.001$ ).

The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) is a transmembrane tyrosine kinase receptor belonging to a family of four structurally related receptors (FGFR1–4). They play an important role in multiple physiological cellular processes, such as proliferation, differentiation, regulation of angiogenesis, wound healing and embryological development (Martinez-Torrecuadrada et al. 2005; Turner and Grose 2010). In the past, different studies showed that overexpression (Qing et al. 2009) and activating mutations in the FGFR3 gene are associated with autosomal dominant skeletal disorders such as hypochondroplasia, achondroplasia, SADDAN (severe achondroplasia with developmental delay and acanthosis nigricans) and thanatophoric dysplasia (van Rhijn et al. 2002; Webster and Donoghue 1997). However, the complex signalling pathways of the FGFR family also show potential oncogenic and tumour suppressive functions (Turner and Grose 2010; Kohler et al. 2012). During the last years, several authors identified genetic alterations such as amplification, mutation and translocation in the FGFR family in correlation with different tumours such as bladder cancer, breast cancer, gastric cancer, endometrial cancer, prostate cancer and cervical cancer (Turner and Grose 2010; Cappellen et al. 1999; Dutt et al. 2008; Hernandez et al. 2009; Kunii et al. 2008). Therefore, we performed mutational analyses on cases with high expression of FGFR3. We analysed hot spots of the FGFR3 gene located on chromosome 4p16.3 with already known activating mutations on exons 7, 10 and 15 in bladder cancer and prostate cancer (Hernandez et al. 2009). Our molecular analyses showed no mutations in the hot spots. However, next generation sequencing might identify new targets.

To the best of our knowledge, there are no studies until now dealing with the role of FGFR3 in sarcomas, especially in UPS. The possibility of using FGFR3-targeting antibodies as anticancer therapy has been shown in different studies. Inter alia, it could be demonstrated an antiproliferative effect on bladder cancer cells and *t*(4; 14)-positive multiple myeloma (Martinez-Torrecuadrada et al. 2005; Qing et al. 2009). Following our results, FGFR3 might classify UPS into further subgroups by understanding its biology and it might also represent a potential target for anticancer therapies.

Additionally, we performed mutational analyses on highly expressed specimens of epidermal growth factor

receptor (EGFR), because there are already activating mutations known on exons 18, 19, 20 and 21 of the EGFR gene in non-small cell lung cancer (Han et al. 2011). The EGFR gene is located on chromosome 7p12. Even here, we found no mutations in the examined hot spots (exon 18, 19, 20 and 21) in our tumour specimens. Comparing UPS, low-grade sarcomas and tumours of the fasciitis family our study show that different expression patterns do exist supporting the different phenotype and malignant potential of these tumours. The expressions of IGF2 and FGFR3 are higher in the undifferentiated sarcomas indicating a role in advanced tumours. Interestingly, RTKs are also expressed in tumours of the fasciitis family, which are proliferating tumours, however, generally in a lesser amount. Interestingly, the very recently described USP6 translocation in tumours of the fasciitis family also indicated that the distinction between a reactive and a neoplastic lesion is becoming less demarcated, and more research is required to understand the nature of tumours of the fasciitis family (Amary et al. 2013).

In conclusion, we show in this study that high expressions of IGF2 and FGFR3 on protein level are significantly associated with tumour progression, FNCLCC grading and Ki67 in undifferentiated pleomorphic sarcomas; furthermore, the markers classify a subgroup of UPS with a more aggressive potential. Tumours with high IGF2 and FGFR3 expression might indicate a tumour subgroup eligible for a more aggressive treatment. However, within the UPS group, they are no prognostic markers. Further studies are needed to explore the functional role of IGF2 and FGFR3 in pleomorphic undifferentiated sarcomas.

**Acknowledgments** We are grateful to Barbara Bergholz and other colleagues from the Institute of Pathology for technical assistance.

**Conflict of interest** All authors declare no conflict of competing interest.

## References

- Amary MF, Ye H, Berisha F, Tirabosco R, Presneau N, Flanagan AM (2013) Detection of USP6 gene rearrangement in nodular fasciitis: an important diagnostic tool. *Virchows Arch Int J Pathol* 463(1):97–98. doi:10.1007/s00428-013-1418-0
- Antonescu CR, Yoshida A, Guo T, Chang NE, Zhang L, Agaram NP, Qin LX, Brennan MF, Singer S, Maki RG (2009) KDR activating mutations in human angiosarcomas are sensitive to specific kinase inhibitors. *Cancer Res* 69(18):7175–7179. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2068
- Bakkar AA, Wallerand H, Radvanyi F, Lahaye JB, Pissard S, Lecerf L, Kouyoumdjian JC, Abbou CC, Paire JC, Jaurand MC, Thiery JP, Chopin DK, de Medina SG (2003) FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 63(23):8108–8112
- Barretina J, Taylor BS, Banerji S, Ramos AH, Lagos-Quintana M, Decarolis PL, Shah K, Socci ND, Weir BA, Ho A, Chiang DY, Reva B, Mermel CH, Getz G, Antipin Y, Beroukhim R, Major JE, Hatton C, Nicoletti R, Hanna M, Sharpe T, Fennell TJ, Cibulskis K, Onofrio RC, Saito T, Shukla N, Lau C, Nelder S, Silver SJ, Sougnez C, Viale A, Winckler W, Maki RG, Garraway LA, Lash A, Greulich H, Root DE, Sellers WR, Schwartz GK, Antonescu CR, Lander ES, Varmus HE, Ladanyi M, Sander C, Meyerson M, Singer S (2010) Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nat Genet* 42(8):715–721. doi:10.1038/ng.619
- Busund LT, Ow KT, Russell P, Crowe PJ, Yang JL (2004) Expression of insulin-like growth factor mitogenic signals in adult soft-tissue sarcomas: significant correlation with malignant potential. *Virchows Arch Int J Pathol* 444(2):142–148. doi:10.1007/s00428-003-0931-y
- Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F (1999) Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* 23(1):18–20. doi:10.1038/12615
- Dei Tos AP (2006) Classification of pleomorphic sarcomas: where are we now? *Histopathology* 48(1):51–62. doi:10.1111/j.1365-2559.2005.02289.x
- Do H, Krypuy M, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A (2008) High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer* 8:142. doi:10.1186/1471-2407-8-142
- Dutt A, Salvesen HB, Chen TH, Ramos AH, Onofrio RC, Hatton C, Nicoletti R, Winckler W, Grewal R, Hanna M, Wyhs N, Ziaugra L, Richter DJ, Trovik J, Engelsen IB, Stefansson IM, Fennell T, Cibulskis K, Zody MC, Akslen LA, Gabriel S, Wong KK, Sellers WR, Meyerson M, Greulich H (2008) Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(25):8713–8717. doi:10.1073/pnas.0803791105
- Endo M, Nielsen TO (2012) Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma. *Lancet* 380(9844):801; author reply 801. doi:10.1016/S0140-6736(12)61440-8
- Fletcher CD, Gustafson P, Rydholm A, Willen H, Akerman M (2001) Clinicopathologic re-evaluation of 100 malignant fibrous histiocytomas: prognostic relevance of subclassification. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 19(12):3045–3050
- Fletcher CDM, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer (2013) WHO classification of tumours of soft tissue and bone. World Health Organization classification of tumours, 4th edn. IARC Press, Lyon
- Hamidov Z, Altendorf-Hofmann A, Chen Y, Settmacher U, Petersen I, Knosel T (2011) Reduced expression of desmocollin 2 is an independent prognostic biomarker for shorter patients survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 64(11):990–994. doi:10.1136/jclinpath-2011-200099
- Han B, Zhou X, Zhang RX, Zang WF, Chen ZY, Song HD, Wan HY, Zheng CX (2011) Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in NSCLC patients. *Oncol Lett* 2(6):1233–1237. doi:10.3892/ol.2011.366
- Hernandez S, de Muga S, Agell L, Juanpere N, Esgueva R, Lorente JA, Mojal S, Serrano S, Lloreta J (2009) FGFR3 mutations in prostate cancer: association with low-grade tumors. *Mod Pathol Off J US Can Acad Pathol* 22(6):848–856. doi:10.1038/modpathol.2009.46
- Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE (2000) The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 21(3):215–244
- Knosel T, Emde A, Schluns K, Chen Y, Jurchott K, Krause M, Dietel M, Petersen I (2005) Immunoprofiles of 11 biomarkers using tissue microarrays identify prognostic subgroups in colorectal cancer. *Neoplasia* 7(8):741–747
- Koea JB, Leung D, Lewis JJ, Brennan MF (2003) Histopathologic type: an independent prognostic factor in primary soft tissue sarcoma of the extremity? *Ann Surg Oncol* 10(4):432–440



- Kohler LH, Mireskandari M, Knosel T, Altendorf-Hofmann A, Kunze A, Schmidt A, Presselt N, Chen Y, Petersen I (2012) FGFR1 expression and gene copy numbers in human lung cancer. *Virchows Arch Int J Pathol* 461(1):49–57. doi:10.1007/s00428-012-1250-y
- Kunii K, Davis L, Gorenstein J, Hatch H, Yashiro M, Di Bacco A, Elbi C, Lutterbach B (2008) FGFR2-amplified gastric cancer cell lines require FGFR2 and ErbB3 signaling for growth and survival. *Cancer Res* 68(7):2340–2348. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5229
- Kurzrock R, Patnaik A, Aisner J, Warren T, Leong S, Benjamin R, Eckhardt SG, Eid JE, Greig G, Habben K, McCarthy CD, Gore L (2010) A phase I study of weekly R1507, a human monoclonal antibody insulin-like growth factor-I receptor antagonist, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Research* 16(8):2458–2465. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-3220
- Lehnardt M, Daigeler A, Homann HH, Schwaiblmair V, Goertz O, Kuhnen C, Steinau HU (2009) MFH revisited: outcome after surgical treatment of undifferentiated pleomorphic or not otherwise specified (NOS) sarcomas of the extremities – an analysis of 140 patients. *Langenbeck's archives of surgery/Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie* 394(2):313–320. doi:10.1007/s00423-008-0368-5
- LeRoith D, Roberts CT Jr (2003) The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 195(2):127–137
- Martinez-Torrecuadrada J, Cifuentes G, Lopez-Serra P, Saenz P, Martinez A, Casal JI (2005) Targeting the extracellular domain of fibroblast growth factor receptor 3 with human single-chain Fv antibodies inhibits bladder carcinoma cell line proliferation. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 11(17):6280–6290. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0282
- Qing J, Du X, Chen Y, Chan P, Li H, Wu P, Marsters S, Stawicki S, Tien J, Totpal K, Ross S, Stinson S, Dornan D, French D, Wang QR, Stephan JP, Wu Y, Wiesmann C, Ashkenazi A (2009) Antibody-based targeting of FGFR3 in bladder carcinoma and t(4;14)-positive multiple myeloma in mice. *J Clin Invest* 119(5):1216–1229. doi:10.1172/JCI38017
- Rikhs B, de Jong S, Suurmeijer AJ, Meijer C, van der Graaf WT (2009) The insulin-like growth factor system and sarcomas. *J Pathol* 217(4):469–482. doi:10.1002/path.2499
- Schwartz GK, Tap WD, Qin LX, Livingston MB, Undevia SD, Chmielowski B, Agulnik M, Schuetze SM, Reed DR, Okuno SH, Ludwig JA, Keedy V, Rietschel P, Kraft AS, Adkins D, Van Tine BA, Brockstein B, Yim V, Bitas C, Abdullah A, Antonescu CR, Condy M, Dickson MA, Vasudeva SD, Ho AL, Doyle LA, Chen HX, Maki RG (2013) Cixutumumab and temsirolimus for patients with bone and soft-tissue sarcoma: a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 14(4):371–382. doi:10.1016/S1470-2045(13)70049-4
- Steigen SE, Schaeffer DF, West RB, Nielsen TO (2009) Expression of insulin-like growth factor 2 in mesenchymal neoplasms. *Mod Pathol Off J US Can Acad Pathol* 22(7):914–921. doi:10.1038/modpathol.2009.48
- Turner N, Grose R (2010) Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 10(2):116–129. doi:10.1038/nrc2780
- van der Graaf WT, Blay JY, Chawla SP, Kim DW, Bui-Nguyen B, Casali PG, Schoffski P, Aglietta M, Staddon AP, Beppu Y, Le Cesne A, Gelderblom H, Judson IR, Araki N, Ovali M, Marreaud S, Hodge R, Dewji MR, Coens C, Demetri GD, Fletcher CD, Dei Tos AP, Hohenberger P (2012) Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 379(9829):1879–1886. doi:10.1016/S0140-6736(12)60651-5
- van Rhijn BW, van Tilborg AA, Lurkin I, Bonaventure J, de Vries A, Thierry JP, van der Kwast TH, Zwarthoff EC, Radvanyi F (2002) Novel fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutations in bladder cancer previously identified in non-lethal skeletal disorders. *Eur J Hum Genet (EJHG)* 10(12):819–824. doi:10.1038/sj.ejhg.5200883
- Webster MK, Donoghue DJ (1997) FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing. *Trends Genet (TIG)* 13(5):178–182
- Yuen JS, Macaulay VM (2008) Targeting the type 1 insulin-like growth factor receptor as a treatment for cancer. *Expert Opin Ther Targets* 12(5):589–603. doi:10.1517/14728222.12.5.589

## 6. Diskussion

Die erfolgreiche Behandlung von fortgeschrittenen gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) mit Tyrosinkinase-Inhibitoren gibt Hoffnung, dass in Zukunft auch andere Malignitäten von einer ähnlichen Behandlung profitieren könnten (Antonescu et al. 2009, Barretina et al. 2010).

Neueste klinische Studien über Inhibitoren gegen eine Vielzahl von Tyrosinkinasen geben auch Hoffnung auf verbesserte Therapiemöglichkeiten von metastasierten Weichteiltumoren. Deshalb werden zuverlässige prädiktive und prognostische Marker dringend benötigt. Diese Marker könnten aktivierte Mutationen identifizieren, die für eine Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren geeignet wären (Endo und Nielsen 2012, van der Graaf et al. 2012).

Die analysierten Gewebeproben der Weichteiltumoren in unserer Studie wurden dem Archiv des Instituts für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena entnommen. Das Institut ist seit 1978 als pathologisches Konsultations- und Referenzzentrum für Weichteiltumoren in Deutschland tätig. Unsere Auswahl umfasst insgesamt 327 Weichteiltumoren, bestehend aus undifferenzierten pleomorphen Sarkomen, low-grade fibromyxoiden Sarkomen, low-grade myofibroblastischen Sarkomen und myxoinflammatorisch-fibroblastischen Sarkomen sowie pseudosarkomatösen Tumoren der Faszitis-Familie. Alle Tumorproben wurden von uns erneut gesichtet und bezüglich der Diagnose überprüft. Wir analysierten die Gewebeproben hinsichtlich der Proteinexpression verschiedener Marker einschließlich Rezeptor-Tyrosinkinasen.

Des Weiteren untersuchten wir mögliche Korrelationen zwischen der Expression der verschiedenen Antikörper einerseits und klinisch-pathologischen Parametern andererseits. Zusätzlich führten wir Mutationsanalysen bei Tumoren mit hoch exprimierten Rezeptor-Tyrosinkinasen von EGFR und FGFR3 durch, um aktive Mutationen zu identifizieren, die möglicherweise für eine Therapie mit gezielten Kinaseinhibitoren zur Verfügung stehen könnten.

Unsere immunhistochemische Analyse von insgesamt 10 Markern erfolgte mit Hilfe von Tissue-Microarrays (TMA). Hierbei handelt es sich um eine Standardmethode für eine in-situ Proteinanalyse. Die Kombination von Immunhistochemie mit der TMA-Technologie ermöglicht eine gleichzeitige Analyse von Hunderten von



Gewebeproben mit einem beispiellosen Grad an experimenteller Standardisierung (Hamidov et al. 2011).

Unseres Wissens ist dies die bisher größte Studie, die die Expression von RTKs in Spindelzellsarkomen untersucht.

Als Ergebnis zeigte sich bei den undifferenzierten pleomorphen Sarkomen (UPS) eine hohe Expression von IGF2 in 86%, FGFR3 in 69%, PDGFR- $\alpha$  in 62%, PDGFR- $\beta$  in 39%, FGFR1 in 8%, EGFR in 5% und KDR/VEGFR2 in 3% der Fälle.

Unsere Studie weist auf, dass eine hohe IGF2-Expression auf Proteinebene signifikant vermehrt in UPS vorkommt im Vergleich zu low-grade Sarkomen oder zu Tumoren der Faszitis-Familie. Des Weiteren konnte eine signifikante Korrelation zwischen hoher IGF2-Expression einerseits und hohem Malignitätsgrad (G3) der UPS (FNCLCC, G3 versus G2,  $p < 0,05$ ) sowie großer Tumorausdehnung und hohem Ki67-Index andererseits nachgewiesen werden.

Das IGF-Signalsystem ist bekannt dafür, dass es eine entscheidende Rolle beim Wachstum sowie bei Funktion und Entwicklung von vielen Gewebearten spielt (LeRoith und Roberts 2003). Es besteht aus drei Liganden, IGF1, IGF2 und Insulin, die mit dem IGF1-Rezeptor (IGF1R) der Zelloberfläche interagieren. Es handelt sich hierbei um einen Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität (Rikhof et al. 2009, Steigen et al. 2009). In vielen Studien wurde das IGF-System bereits mit der Entwicklung und Progression von Tumoren in Verbindung gebracht (Busund et al. 2004, Khandwala et al. 2000, LeRoith und Roberts 2003, Rikhof et al. 2009, Steigen et al. 2009). Interessanterweise publizierten Steigen et al. eine Studie mit 65 Tumorproben, in der eine Überexpression von IGF2 in 32% der untersuchten UPS dargestellt werden konnte (Steigen et al. 2009). Diese Ergebnisse wurden durch unsere größer angelegte Studie unterstützt. Wir untersuchten 200 Fälle von UPS und konnten eine hohe Expression in 86% der Tumoren beobachten. Besonders in Hinblick auf zukünftige Therapiemöglichkeiten der UPS scheint der IGF2-Signalweg ein vielversprechender Weg zu sein, betrachtet man zum Beispiel die Möglichkeiten der Behandlung von Ewing-Sarkomen mit dem humanen anti-IGFR1 Antikörper R1507 (Kurzrock et al. 2010, Yuen und Macaulay 2008). IGFR1 scheint jedoch kein prädiktiver Marker zu sein, wie in einer erst kürzlich veröffentlichten klinischen Studie über Weichteilsarkome beschrieben (Schwartz et al. 2013).

Lehnhardt et al. haben herausgefunden, dass negative Operationsränder, Größe und Grading einen signifikant hohen Einfluss auf das Gesamtüberleben ihrer 140

Patienten mit UPS gehabt haben. Hingegen hatten Operationsgebiet, adjuvante Chemotherapie oder Bestrahlung sowie Infiltrationstiefe des Tumors keinen Einfluss (Lehnhardt et al. 2009). Ähnliche Ergebnisse für Tumorgröße und Grading wurden von den Chirurgen des Memorial Sloan-Kettering Cancer Centers veröffentlicht (Koea et al. 2003).

Bei dem fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) konnten wir in 69,3% der von uns untersuchten UPS eine hohe Expression nachweisen. Sie korrelierte statistisch signifikant mit hohem FNCLCC-Grading ( $p = 0,016$ ) und hohem Ki67-Index ( $p = 0,001$ ).

Bei FGFR3 handelt es sich um einen transmembranösen Tyrosinkinase-Rezeptor, der zu einer Familie von vier strukturell verwandten Rezeptoren gehört (FGFR1 - 4). Sie spielen eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen zellulären Prozessen, wie zum Beispiel Proliferation, Differenzierung, Regulation der Angiogenese, Wundheilung und embryonaler Entwicklung (Martinez-Torrecuadrada et al. 2005, Turner und Grose 2010).

In der Vergangenheit konnten unterschiedliche Studien zeigen, dass eine Überexpression (Qing et al. 2009) und aktivierte Mutationen im FGFR3-Gen mit autosomal dominanten Skeletterkrankungen, wie Hypochondroplasie, Achondroplasie, SADDAN und thanatophorer Dysplasie assoziiert sind (van Rhijn et al. 2002, Webster und Donoghue 1997). Der komplexe Signalweg der FGFR-Familie zeigt einerseits potentiell onkogene und andererseits tumorsuppressive Funktionen (Turner und Grose 2010, Kohler et al. 2012). Innerhalb der letzten Jahre konnten genetische Alterationen wie Amplifikation, Mutation und Translokation in der FGFR-Familie identifiziert werden, die in Verbindung mit verschiedenen Tumoren stehen, wie zum Beispiel Blasen-, Brust-, Magen-, Endometrium-, Prostata- und Zervixkarzinom (Turner und Grose 2010, Cappellen et al. 1999, Dutt et al. 2008, Hernandez et al. 2009, Kunii et al. 2008).

Deshalb führten wir bei Fällen mit erhöhter FGFR3-Expression Mutationsanalysen durch. Wir analysierten Hotspots des FGFR3-Gens, lokalisiert auf dem Chromosom 4p16.3, die bereits bekannte aktivierte Mutationen auf den Exons 7, 10 und 15 bei Blasenkrebs und Prostatakrebs aufwiesen (Hernandez et al. 2009). Unsere molekularen Analysen zeigten keine Mutationen der Hotspots. Gleichwohl könnte eine weitere Sequenzierung neue Angriffsstellen für eine Therapie identifizieren.

Unseres Wissens gibt es bisher keine Studien, die sich mit der Rolle von FGFR3 in Sarkomen, insbesondere in UPS, beschäftigen. Die Möglichkeit, FGFR3-gezielte Antikörper im Bereich der Antikrebstherapie zu verwenden, wurde in mehreren Studien gezeigt. Unter anderem konnte ein antiproliferativer Effekt auf Zellen bei Blasenkrebs und t(4;14)-positivem multiplem Myelom nachgewiesen werden (Martinez-Torrecuadrada et al. 2005, Qing et al. 2009). Nach unseren Ergebnissen könnte FGFR3 aufgrund dieser biologischen Eigenschaften UPS in weitere Subgruppen unterteilen. Dies könnte in Zukunft eine potentielle Angriffsstelle der Antikrebstherapie darstellen.

Zusätzlich führten wir Mutationsanalysen bei den Tumorproben mit einer hohen EGFR-Expression durch. Auch auf dem EGFR-Gen sind bereits aktivierte Mutationen bekannt. Diese befinden sich auf den Exons 18, 19, 20 und 21 bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Han et al. 2011). Das EGFR-Gen ist lokalisiert auf dem Chromosom 7p12. Auch hier konnten wir keine Mutationen der untersuchten Hotspots (Exons 18 - 21) in unserem Tumorkollektiv finden.

Vergleicht man UPS, low-grade Sarkome und Tumoren der Faszitis-Familie miteinander, zeigt unsere Studie, dass unterschiedliche Expressionsmuster existieren, die den unterschiedlichen Phänotyp und das maligne Potential dieser Tumoren unterstreichen. Die Expression von IGF2 und FGFR3 ist in undifferenzierten Sarkomen erhöht, was auf ihre Rolle bei fortgeschrittenen Tumoren hinweist. Interessanterweise werden RTKs, wenn auch in geringerem Ausmaß, in Tumoren der Faszitis-Familie exprimiert, bei denen es sich um proliferative Tumoren handelt. Die vor kurzem beschriebene USP6-Translokation in Tumoren der Faszitis-Familie weist darauf hin, dass die Unterscheidung zwischen einer reaktiven und einer neoplastischen Läsion weniger scharf abgegrenzt erscheint und weitere Forschung notwendig ist, um die Natur der Tumoren der Faszitis-Familie zu verstehen (Amary et al. 2013).

## **7. Schlussfolgerung**

Zusammenfassend können wir in dieser Studie einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen hoher Expression von IGF2 und FGFR3 auf der einen Seite und der Tumorprogression, höherem FNCLCC-Grading und einer erhöhten Ki67-Expression der UPS auf der anderen Seite nachweisen. Diese Marker klassifizieren eine Untergruppe der UPS mit einem erhöhten aggressiven Potential. Tumoren mit hoher IGF2- und FGFR3-Expression könnten eine Subgruppe darstellen, die für eine aggressivere Behandlung in Frage käme. In Zukunft werden weitere Studien notwendig sein, um die funktionelle Rolle von IGF2 und FGFR3 in UPS zu erforschen.

## 8. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Amary MF, Ye H, Berisha F, Tirabosco R, Presneau N, Flanagan AM. 2013. Detection of USP6 gene rearrangement in nodular fasciitis: an important diagnostic tool. *Virchows Archiv*, 463 (1):97-98.
2. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*, 22(10):1276-312.
3. Antonescu CR, Yoshida A, Guo T, Chang NE, Zhang L, Agaram NP, Qin LX, Brennan MF, Singer S, Maki RG. 2009. KDR activating mutations in human angiosarcomas are sensitive to specific kinase inhibitors. *Cancer research*, 69 (18):7175-7179.
4. Barretina J, Taylor BS, Banerji S, Ramos AH, Lagos-Quintana M, Decarolis PL, Shah K, Socci ND, Weir BA, Ho A, Chiang DY, Reva B, Mermel CH, Getz G, Antipin Y, Beroukhir R, Major JE, Hatton C, Nicoletti R, Hanna M, Sharpe T, Fennell TJ, Cibulskis K, Onofrio RC, Saito T, Shukla N, Lau C, Nelander S, Silver SJ, Sougnez C, Viale A, Winckler W, Maki RG, Garraway LA, Lash A, Greulich H, Root DE, Sellers WR, Schwartz GK, Antonescu CR, Lander ES, Varmus HE, Ladanyi M, Sander C, Meyerson M, Singer S. 2010. Subtype-Specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nature Genetics*, 42(8):715-21.
5. Busund LT, Ow KT, Russell P, Crowe PJ, Yang JL. 2004. Expression of insulin-like growth factor mitogenic signals in adult soft-tissue sarcomas: significant correlation with malignant potential. *Virchows Archiv*, 444 (2):142-148.
6. Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F. 1999. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nature genetics*, 23 (1):18-20.
7. Dei Tos AP. 2006. Classification of pleomorphic sarcomas: where are we now? *Histopathology*, 48:51-62.
8. Dutt A, Salvesen HB, Chen TH, Ramos AH, Onofrio RC, Hatton C, Nicoletti R, Winckler W, Grewal R, Hanna M, Wyhs N, Ziaugra L, Richter DJ, Trovik J, Engelsen IB, Stefansson IM, Fennell T, Cibulskis K, Zody MC, Akslen LA, Gabriel S, Wong KK, Sellers WR, Meyerson M, Greulich H. 2008. Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(25):8713-8717.
9. Dutta PR, Maity A. 2007. Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy. *Cancer Lett*, 254(2):165-77.
10. Endo M, Nielsen TO. 2012. Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma. *Lancet*, 380 (9844):801.

11. Fleming JB, Berman RS, Cheng SC, Chen NP, Hunt KK, Feig BW, Respondek PM, Yasko AW, Pollack A, Patel SR, Burgess MA, Papadopoulos NE, Plager C, Zagars G, Benjamin RS, Pollock RE, Pisters PW. 1999. Long-term outcome of patients with American Joint Committee on Cancer stage IIB extremity soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol*, 17(9):2772-80.
12. Fletcher CD, Unni KK, Mertens F. 2002. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. 3<sup>rd</sup> ed. Lyon: IARC Press.
13. Fletcher CD, Hogendoorn P, Mertens F, Bridge J. 2013. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. WHO classification of tumours of soft tissue and bone. 4<sup>th</sup> ed. Lyon: IARC Press.
14. Fletcher CD. 1992. Pleomorphic malignant fibrous histiocytoma: fact or fiction? A critical reappraisal based on 159 tumors diagnosed as pleomorphic sarcoma. *The American journal of surgical pathology*, 16:213-28.
15. Han B, Zhou X, Zhang RX, Zang WF, Chen ZY, Song HD, Wan HY, Zheng CX. 2011. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in NSCLC patients. *Oncology letters*, 2(6):1233-1237.
16. Hamidov Z, Altendorf-Hofmann A, Chen Y, Settmacher U, Petersen I, Knosel T. 2011. Reduced expression of desmocollin 2 is an independent prognostic biomarker for shorter patients survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of clinical pathology*, 64(11):990-994.
17. Hernandez S, de Muga S, Agell L, Juanpere N, Esgueva R, Lorente JA, Mojal S, Serrano S, Lloreta J. 2009. FGFR3 mutations in prostate cancer: association with low-grade tumors. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 22(6):848-856.
18. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. 2007. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal*, 19(10):2003-12.
19. Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, Seither P, Kraut N, Capodiecci P, Donovan M, Cordon-Cardo C, Beug H, Grünert S. 2006. Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J Clin Invest*, 116(6):1561-70.
20. Karkkainen MJ, Petrova TV. 2000. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene*, 19(49):5598-605.
21. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. 2000. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocrine reviews*, 21(3):215-244
22. Kempson RL, Kyriakos M. 1972. Fibroxanthosarcoma of the soft tissues. A type of malignant fibrous histiocytoma. *Cancer*, 29(4):961-76.

23. Kohler LH, Mireskandari M, Knosel T, Altendorf-Hofmann A, Kunze A, Schmidt A, Presselt N, Chen Y, Petersen I. 2012. FGFR1 expression and gene copy numbers in human lung cancer. *Virchows Archiv*, 461 (1):49-57.
24. Kohler N, Lipton A. 1974. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp Cell Res*, 87(2):297-301.
25. Koea JB, Leung D, Lewis JJ, Brennan MF. 2003. Histopathologic type: an independent prognostic factor in primary soft tissue sarcoma of the extremity? *Annals of surgical oncology*, 10(4):432-440.
26. Kunii K, Davis L, Gorenstein J, Hatch H, Yashiro M, Di Bacco A, Elbi C, Lutterbach B. 2008. FGFR2-amplified gastric cancer cell lines require FGFR2 and Erbb3 signaling for growth and survival. *Cancer research*, 68(7):2340-2348.
27. Kurzrock R, Patnaik A, Aisner J, Warren T, Leong S, Benjamin R, Eckhardt SG, Eid JE, Greig G, Habben K, McCarthy CD, Gore L. 2010. A phase I study of weekly R1507, a human monoclonal antibody insulin-like growth factor-I receptor antagonist, in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research*, 16 (8):2458-2465.
28. Laskin WB, Silverman TA, Enzinger FM. 1988. Postradiation soft tissue sarcomas. An analysis of 53 cases. *Cancer*, 62(11):2330-40.
29. Lehnhardt M, Daigeler A, Homann HH, Schwaiberger V, Goertz O, Kuhnen C, Steinau HU. 2009. MFH revisited: outcome after surgical treatment of undifferentiated pleomorphic or not otherwise specified (NOS) sarcomas of the extremities -- an analysis of 140 patients. *Langenbeck's archives of surgery*, 394(2):313-320.
30. LeRoith D, Roberts CT, Jr. 2003. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer letters*, 195(2):127-137.
31. Liu KW, Hu B, Cheng SY. 2011. Platelet-derived growth factor signaling in human malignancies. *Chin J Cancer*, 30(9):581-4.
32. Martinez-Torrecedrada J, Cifuentes G, López-Serra P, Saenz P, Martínez A, Casal JI. 2005. Targeting the extracellular domain of fibroblast growth factor receptor 3 with human single-chain Fv antibodies inhibits bladder carcinoma cell line proliferation. *Clinical cancer research*, 11:6280-90.
33. Mechttersheimer G, Renner M, Penzel R, Schirmacher P. 2011. Pleomorphe High-grade-Sarkome der Weichgewebe: Ist die Subklassifikation zeitgemäss?. *Der Pathologe*, 32:47-56.
34. Meyerson M, Singer S. 2010. Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nature genetics*, 42(8):715-721.
35. Murgue B, Tsunekawa S, Rosenberg I, deBeaumont M, Podolsky DK. 1994. Identification of a novel variant form of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3 IIIb) in human colonic epithelium. *Cancer Res*, 54(19):5206-11.

36. O'Brien JE, Stout AP. 1964. Malignant fibrous xanthomas. *Cancer*, 17:1445-55.
37. Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H. 2005. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol*, 1:2005.0010.
38. Ozzello L, Stout AP, Murray MR. 1963. Cultural characteristics of malignant histiocytomas and fibrous xanthomas. *Cancer*, 331-44.
39. Qing J, Du X, Chen Y, Chan P, Li H, Wu P, Marsters S, Stawicki S, Tien J, Totpal K, Ross S, Stinson S, Dornan D, French D, Wang QR, Stephan JP, Wu Y, Wiesmann C, Ashkenazi A. 2009. Antibody-based targeting of FGFR3 in bladder carcinoma and t(4;14)-positive multiple myeloma in mice. *The Journal of clinical investigation*, 119(5):1216-1229.
40. Rikhs B, de Jong S, Suurmeijer AJ, Meijer C, van der Graaf WT. 2009. The insulin-like growth factor system and sarcomas. *The Journal of pathology*, 217(4):469-482.
41. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. 1974. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(4):1207-10.
42. Scholzen T, Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182(3):311-22.
43. Schwartz GK, Tap WD, Qin LX, Livingston MB, Undavia SD, Chmielowski B, Agulnik M, Schuetze SM, Reed DR, Okuno SH, Ludwig JA, Keedy V, Rietschel P, Kraft AS, Adkins D, Van Tine BA, Brockstein B, Yim V, Bitas C, Abdullah A, Antonescu CR, Condy M, Dickson MA, Vasudeva SD, Ho AL, Doyle LA, Chen HX, Maki RG. 2013. Cixutumumab and temsirolimus for patients with bone and soft-tissue sarcoma: a multicentre, open-label, phase 2 trial. *The lancet oncology*, 14(4):371-382.
44. Shim AH, Liu H, Focia PJ, Chen X, Lin PC, He X. 2010. Structures of a platelet-derived growth factor/propeptide complex and a platelet-derived growth factor/receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(25):11307-12.
45. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzoni G, Gillesse D, Gabbiani G. 1986. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol*, 103(6 Pt 2):2787-96.
46. Steigen SE, Schaeffer DF, West RB, Nielsen TO. 2009. Expression of insulin-like growth factor 2 in mesenchymal neoplasms. *Modern pathology*, 22(7):914-921.
47. Turner N, Grose R. 2010. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature reviews Cancer*, 10:116-29.
48. Vajo Z, Francomano CA, Wilkin DJ. 2000. The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: the achondroplasia family of



skeletal dysplasias, Muenke craniosynostosis, and Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Endocr Rev*, 21(1):23-39.

49. van der Graaf WT, Blay JY, Chawla SP, Kim DW, Bui-Nguyen B, Casali PG, Schoffski P, Aglietta M, Staddon AP, Beppu Y, Le Cesne A, Gelderblom H, Judson IR, Araki N, Ouali M, Marreaud S, Hodge R, Dewji MR, Coens C, Demetri GD, Fletcher CD, Dei Tos AP, Hohenberger P. 2012. Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebocontrolled phase 3 trial. *Lancet*, 379(9829):1879-1886.
50. van Rhijn BW, van Tilborg AA, Lurkin I, Bonaventure J, de Vries A, Thiery JP, van der Kwast TH, Zwarthoff EC, Radvanyi F. 2002. Novel fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutations in bladder cancer previously identified in non-lethal skeletal disorders. *European journal of human genetics*, 10(12):819-824.
51. Webster MK, Donoghue DJ. 1997. FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing. *Trends in genetics*, 13 (5):178-182.
52. Weiss SW, Enzinger FM. 1978. Malignant fibrous histiocytoma: an analysis of 200 cases. *Cancer*, 41(6):2250-66.
53. Ylä-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. 2007. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol*, 49(10):1015-26.
54. Yuen JS, Macaulay VM. 2008. Targeting the type 1 insulin-like growth factor receptor as a treatment for cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*, 12(5):589-603.

## **9. Anhang**

### **9.1. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Petersen für die Übernahme der Promotion als Doktorvater sowie Herrn Prof. Knösel für seine Hilfe und Betreuung mit seiner überaus engagierten und hilfsbereiten Art.

Bei Frau Prof. Altendorf-Hofmann möchte ich mich für die wertvolle Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei dieser Arbeit bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei der Abteilung für Pathologie der FSU Jena bedanken für die Unterstützung bei der praktischen Durchführung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Mann, die mich stets unterstützt haben.

## 9.2. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Thomas Knösel,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

---

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers